

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-083819

(43)Date of publication of application : 31.03.1995

(51)Int.Cl.

G01N 15/14

(21)Application number : 06-124209

(71)Applicant : CANON INC

(22)Date of filing : 13.05.1994

(72)Inventor : YAMAZAKI TATSUYA

(30)Priority

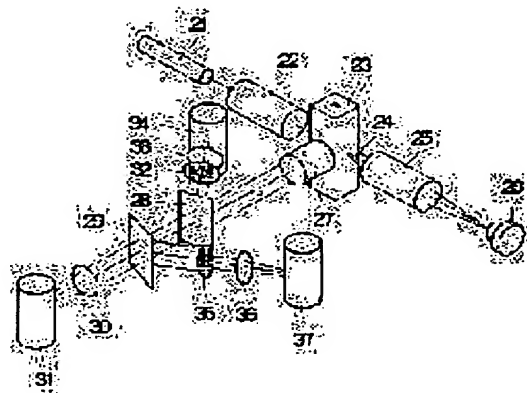
Priority number : 05200249 Priority date : 20.07.1993 Priority country : JP

## (54) PARTICLE MEASURING APPARATUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a particle measuring apparatus excellent in the ability to sort out particles while polarization is taken into account.

CONSTITUTION: An illuminating optical system 22, a flow cell 23, a stopper 24 for blocking rectilinear laser beams, a forward-scattering converging optical system 25, and a forward-scattering detector 26 are aligned in front of a laser beam source 21. A converging optical system 27 for sideways scattering and fluorescence, a dichromatic mirror 28 with an angle of incidence set to  $30^\circ$ , a dichromatic mirror 29 with an angle of incidence also set to  $30^\circ$ , a lens 30, and a detector 31 are aligned in the direction of reflection from the flow cell 23. An aperture 32, a lens 33 and a detector 34 are arranged in the direction of reflection from the dichromatic mirror 28, and a noneccentric aperture 35, a lens 36 and a detector 37 are arranged in the direction of reflection from the dichromatic mirror 29.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-83819

(43)公開日 平成7年(1995)3月31日

(51)Int.Cl.<sup>9</sup>

G 0 1 N 15/14

識別記号

P

C

D

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平6-124209

(22)出願日 平成6年(1994)5月13日

(31)優先権主張番号 特願平5-200249

(32)優先日 平5(1993)7月20日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 山▲崎▼ 達也

神奈川県川崎市中原区今井上町53番地 キ

ヤノン株式会社小杉事業所内

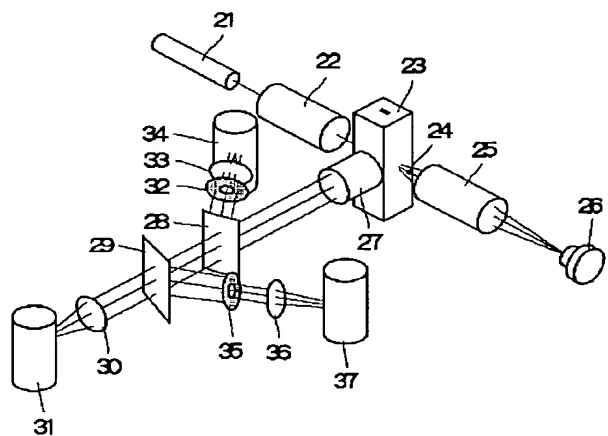
(74)代理人 弁理士 日比谷 征彦

(54)【発明の名称】 粒子測定装置

(57)【要約】

【目的】 偏光を考慮した粒子分別能力に優れる粒子測定装置を提供する。

【構成】 レーザー光源21の前方には、照射光学系22、フローセル23、直進レーザー光を遮蔽するストップ24、前方散乱光集光光学系25、前方散乱光検出器26が配列されている。フローセル23の反射方向には、側方散乱光及び蛍光の集光光学系27、入射角が30°に設定されたダイクロイックミラー28、同様に入射角が30°に設定されたダイクロイックミラー29、レンズ30、検出器31が配列されている。ダイクロイックミラー28の反射方向には制限開口32、レンズ33、検出器34が配置され、ダイクロイックミラー29の反射方向には偏心のない制限開口35、レンズ36、検出器37が配置されている。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 光源と、該光源からの光を被検粒子に照射する照射手段と、該被検粒子より生ずる散乱光及び（又は）蛍光から成る信号光を集光する集光手段と、該信号光を分光分割する分割手段と、該信号光を検知する検出手段とを具備する粒子測定装置において、前記分割手段に入射する前記信号光の入射角を、前記分割手段が有する偏光特性が入射角が  $45^\circ$  のときの偏光特性よりも小さくなる角度に設定したことを特徴とする粒子測定装置。

【請求項 2】 前記分割手段への入射角は  $45^\circ$  よりも小さい請求項 1 に記載の粒子測定装置。

【請求項 3】 前記分割手段への入射角は  $20 \sim 30^\circ$  とした請求項 1 に記載の粒子測定装置。

【請求項 4】 前記分割手段はダイクロイックミラーとした請求項 1 に記載の粒子測定装置。

【請求項 5】 前記被検粒子は流路中を流れる粒子とした請求項 1 に記載の粒子測定装置。

【請求項 6】 前記被検粒子は細胞とした請求項 1 に記載の粒子測定装置。

【請求項 7】 前記光源はレーザー光源とした請求項 1 に記載の粒子測定装置。

【請求項 8】 前記被検粒子を照射する光は直線偏光光とした請求項 1 に記載の粒子測定装置。

【請求項 9】 光源と、該光源からの光を被検粒子に照射する照射手段と、該被検粒子より生ずる散乱光及び（又は）蛍光から成る信号光を集光する集光手段と、前記光源からの光及び（又は）前記信号光を反射する反射手段と、前記信号光を検知する検知手段とを具備する粒子測定装置において、前記反射手段に入射する前記光源からの光及び（又は）前記信号光の入射角を、前記反射手段が有する偏光特性が入射角が  $45^\circ$  のときの偏光特性よりも小さくなる角度に設定したことを特徴とする粒子測定装置。

【請求項 10】 前記粒子測定装置は前記信号光の偏光特性を測定する請求項 9 に記載の粒子測定装置。

【請求項 11】 前記反射手段への入射角は  $45^\circ$  よりも小さい請求項 9 に記載の粒子測定装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、被検粒子に光を照射し検体から生ずる散乱光や蛍光を測定する粒子測定装置、特に細胞などの被検粒子の特性を測定する検体測定装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】図 3 は M i e 理論による散乱光の偏光強度分布を示したものであり、横軸は照射光光軸と散乱光集光系光軸の成す角度、縦軸は散乱光の相対強度を対数目盛で表したものである。また、P は照射光の偏光方向と平行な偏光成分を持つ散乱光の強度、V は照射光の偏

光方向と直交する偏光成分を持つ散乱光の強度を表している。

【0003】この図 3 から明らかなように、照射光と直交する方向の散乱光即ち側方散乱光の強度は最小となる。これは後に述べるように、散乱光と蛍光を同時に検出する装置の多くが、側方散乱光と蛍光とを同一の集光系を用いて検出する理由の 1 つである。

【0004】また、照射光が直線偏光であるときには、側方散乱光は直線偏光に直交する方向の偏光成分を持たない。従って、照射光の偏光方向に直交する偏光成分の側方散乱光は M i e 理論によらない散乱ということができる。これは、一般に散乱光偏光解消と呼ばれる現象であり、その原因は散乱光を発生させる被検粒子と散乱光を取得する光学系の配置とにあると考えられている。

【0005】被検粒子を原因とする散乱光偏光解消では、被検粒子内での多重反射や粒子の外形が、M i e 理論が仮定している球形から外れていることが挙げられる。これは被検粒子の特長を解析する上で貴重な情報となり得るものであり、狭義の散乱光偏光解消と呼ぶことができる。一方、光学系の配置を原因とするものは、例えば側方散乱光を取得する集光光学系の開口の大きさが有限であるために、純粋な  $90^\circ$  側方散乱光のみならず、周辺の散乱光も取得してしまうことが挙げられる。

【0006】図 3 では説明されないが、前方散乱光の強度は被検粒子の径の 6 乗に比例するので、被検粒子の大きさを表す変数とされる。また上述のように、側方散乱光は被検粒子の大きさのみならずその形状にも影響されるので、被検粒子の形状を表す変数とされる。

【0007】一方、蛍光の強度分布は等方的強度分布を示す。また、蛍光の偏光方向は照射光のそれを保存するとされる。しかしながら蛍光の寿命は有限であり、その間のブラウン運動や化学変化に対応して蛍光の偏光方向は変化することがある。これは一般に蛍光偏光解消と呼ばれ、散乱光の偏光解消と同様に被検粒子の特長を表す貴重な情報となる。

【0008】検体に光を照射し、検体から生ずる散乱光や蛍光を測定する測定装置の一例として、フローサイトメータ、パーティクルカウンタが従来から知られており、生物学分野、医療分野や半導体工学の分野等で広く用いられている。

【0009】このフローサイトメータの典型的な構成を、図 4 に示すフローサイトメータについて説明する。血液等のサンプル液を前処理として、蛍光試薬等で染色処理し適切な反応時間及び希釈濃度に調整する。そして、これをサンプル液容器 1 に入れ、蒸留水や生理食塩水等のシース液はシース液容器 2 に入れる。サンプル液容器 1 及びシース液容器 2 はそれぞれ図示しない加圧機構により加圧される。

【0010】そして、シースフロー方式によりフローセル 3 内のサンプル液がシース液に包まれて細い流れに収

敏され、フローセル3内の流通部のほぼ中央を通過する。このとき、サンプル液に含まれる個々の細胞、微生物、担体粒子等の被検粒子、即ち検体は分離されて1粒或いは1塊ずつ順次に流れる。この被検粒子の流れに対して、レーザー光源4から出射されたレーザー光が、母線方向が流通部方向及び流通部方向とそれぞれ直交したシリンドリカルレンズ5、6の組によって任意の形状に収斂され照射される。

【0011】被検粒子に照射される光ビームの形状は、一般には流れに対して直交する方向に長径を有する楕円形状であることが望ましい。これは個々の被検粒子の流れの位置が流体内で多少変動しても、被検粒子に均一の強度で光ビームが照射されるようにするためである。同様に、被検粒子に照射される光ビームの位置が若干変動しても、被検粒子に均一の強度で光ビームが照射される。

【0012】被検粒子に光ビームが照射されると散乱光が生ずる。この散乱光の内、光路前方方向に発する前方散乱光は、集光レンズ6、光検出器7によって測光される。なお、照射された光ビームが直接に光検出器7に入射することを防ぐため、光路中の集光レンズ6の手前には光吸収性の微小なストッパ8が設けられ、光源4からの直接光、及び被検粒子を透過した透過光を除去するようになっている。これにより、被検粒子からの散乱光のみを測光することができる。

【0013】また散乱光の内、レーザー光軸及び被検粒子の流れにそれぞれ直交する測定方向に発する光は集光レンズ9で集光される。集光された光はダイクロイックミラー10で反射され、散乱光の波長即ちレーザー光の波長（例えばAr<sup>+</sup>レーザーでは488nm）を選択的に透過させるバンドパスフィルタ11を経て、光検出器12において側方散乱光が測光される。また、被検粒子が蛍光染色されている場合には、散乱光と共に発生する複数色の蛍光を測光するため、集光レンズ9によって集光され、ダイクロイックミラー10を透過した蛍光の内、ダイクロイックミラー13で反射された蛍光からは緑色蛍光波長用（530nm付近）のバンドパスフィルタ14、光検出器15の組によって緑色蛍光が検出され、またダイクロイックミラー13を透過した蛍光からは全反射ミラー16、赤色蛍光波長用（570nm付近）のバンドパスフィルタ17、光検出器18の組によって赤色蛍光が検出される。光検出器7、12、15、18の信号はそれぞれ演算回路19に入力され、演算回路19において粒子の種類や性質等の解析、或いは抗原抗体反応の測定等の演算が行われる。

【0014】一般に上記の装置においては、2方向の散乱光の強度、即ち照射光の進行方向に散乱する前方散乱光と、この方向に直交する方向に散乱する側方散乱光とを測定することで、二次元の散乱光分布図を作成し粒子の分別を行う。更に、細胞等の粒子に特異的に結合する

各種の蛍光標識を付けて照射光で励起された蛍光を測定することにより、三次元以上の分布図を作成し粒子の更なる分別を行う。

【0015】また、照射光にレーザー等の直線偏光を用い、測定光学系中に偏光素子等を設けることで、散乱光や蛍光の偏光特性を測定する装置もある。また、この装置において偏光素子の代りに、プリースタ角に設置したガラス板を用いる装置も知られている。更に、フロー方式を用いず、静置された測定セル中の検体液中に分散させたラテックス粒子から生ずる散乱光や蛍光の偏光特性を測定する装置もある。これらの装置では、上述の各種の散乱光や蛍光に加えて、散乱光や蛍光の偏光特性をパラメータにすることで被検粒子の更なる分別を行っている。

#### 【0016】

【発明が解決しようとする課題】一般に、粒子から生ずる散乱光や蛍光は偏光特性を有する。特に、光源に直線偏光を有するレーザー光を使用したときには、偏光特性が顕著に現れる。ところが、一般に上述の装置で分光手段として使用されているダイクロイックミラーは、それ自身偏光特性を有し、入射する光の偏光特性によってカットオフ波長等の分光特性が変化する。

【0017】図5は典型的なダイクロイックミラーの偏光分光特性を示しており、横軸は波長、縦軸はダイクロイックミラーの反射率であり、実線はp偏光、破線はs偏光の分光特性を表している。図5から明らかなように、p偏光のカットオフ波長は約670nm、s偏光のカットオフ波長は約710nmであり、p偏光とs偏光のカットオフ波長の差は約40nmであることが分かる。

【0018】従って、波長690nm近傍の光はその偏光状態によって、このダイクロイックミラーでの反射率が大きく変化することになる。当然、ダイクロイックミラー以降に設けられた検出器での検出値もまた大きく変化してしまう。つまり、一般にフローサイトメータでは細胞に標識した蛍光の強度や波長を測定することで細胞の特性を求めているが、もし蛍光の強度や波長が変化しないにも拘らず偏光状態が変化した場合には、誤った測定を行ってしまうことになる。

【0019】一般に、ダイクロイックミラーへの入射角を小さくすると、分光特性の偏光特性が著しく減少することが知られている。しかしながら、ダイクロイックミラーは入射角を変えると、そのカットオフ波長等の分光特性も変化してしまう。その様子を表したのが図6であり、図5に示したダイクロイックミラーの入射角を30°にした時の分光反射率を表している。この図6から明らかなように、p偏光のカットオフ波長は約710nm、s偏光のカットオフ波長は約730nmであり、p偏光とs偏光のカットオフ波長の差は約20nmになることが分かる。図5と図6を比較して明らかなように、

カットオフ波長の差は40nmから20nmに半減しているが、p偏光とs偏光のカットオフ波長は共に長波長側に移動している。従って、ダイクロイックミラーの入射角を単に小さくするだけでは所期の性能が得られないことになる。

【0020】蛍光の光強度は微弱であるので、蛍光を検出する光学系には集光効率の高い高NA顕微鏡対物レンズ、特に液浸レンズ等が利用されている。また、蛍光に比べてはるかに強度の強い散乱光との分離を容易にするために、蛍光検出光学系は散乱光の強度が最も弱くなる側方に設け、側方散乱光検出光学系と共通化している。しかしながら、高NA顕微鏡対物レンズは集光方向が広いので、側方散乱光検出光学系で集光された散乱光は、もはや同一の偏光方向を有しているとは云えない。

【0021】プリュースタ角に設置したガラス板の反射率に偏光特性があることは、ここで詳しく述べるまでもなく良く知られている。従って、このプリュースタ角に設置したガラス板等で分光される光の中には、設計者の予期しない光が混入する危険性がある。これらの光は検出器でDC成分として検出され、測定のS/N比を悪化させる原因となる。ガラス板やダイクロイックミラー等に限らず、一般に光を分光する手段や反射する手段や分割する手段は偏光特性を有している。

【0022】本発明の目的は、比較的簡便な光学系を用いながら、散乱光及び（又は）蛍光の分光解析及び偏光解析を精度良く行うことで、粒子分別能力に優れる粒子測定装置を提供することにある。

#### 【0023】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するための第1発明に係る粒子測定装置は、光源と、該光源からの光を被検粒子に照射する照射手段と、該被検粒子より生ずる散乱光及び（又は）蛍光から成る信号光を集光する集光手段と、該信号光を分光分割する分割手段と、該信号光を検知する検出手段とを具備する粒子測定装置において、前記分割手段に入射する前記信号光の入射角を、前記分割手段が有する偏光特性が入射角が45°のときの偏光特性よりも小さくなる角度に設定したことを特徴とする。

【0024】また、第2発明に係る粒子測定装置は、光源と、該光源からの光を被検粒子に照射する照射手段と、該被検粒子より生ずる散乱光及び（又は）蛍光から成る信号光を集光する集光手段と、前記光源からの光及び（又は）前記信号光を反射する反射手段と、前記信号光を検知する検知手段とを具備する粒子測定装置において、前記反射手段に入射する前記光源からの光及び（又は）前記信号光の入射角を、前記反射手段が有する偏光特性が入射角が45°のときの偏光特性よりも小さくなる角度に設定したことを特徴とする。

#### 【0025】

【作用】上述の第1発明の粒子測定装置は、分割手段に

入射する前記信号光の入射角を、前記分割手段が有する偏光特性が入射角が45°のときの偏光特性よりも小さくなる角度に設定する。

【0026】また第2発明の粒子測定装置は、反射手段に入射する前記光源からの光及び（又は）前記信号光の入射角を、前記反射手段が有する偏光特性が入射角が45°のときの偏光特性よりも小さくなる角度に設定する。

#### 【0027】

【実施例】本発明を図1、図2に図示の実施例に基づいて詳細に説明する。図1は本発明をフローサイトメータに適用した第1の実施例を示している。レーザー光源21の前方には、照射光学系22、フローセル23、直進レーザー光を遮光するストップ24、前方散乱光集光光学系25、前方散乱光検出器26が配列されている。フローセル23の反射方向には、側方散乱光及び蛍光の集光光学系27、入射角が45°よりも小さな30°に設定されたダイクロイックミラー28、同様に入射角が45°よりも小さな30°に設定されたダイクロイックミラー29、レンズ30、検出器31が配列されている。ダイクロイックミラー28の反射方向には、制限開口32、レンズ33、検出器34が配置され、ダイクロイックミラー29の反射方向には制限開口35、レンズ36、検出器37が配置されている。

【0028】レーザー光源21から射出したレーザー光は、フローセル23の流れ方向と平行な方向に直線偏光しており、照射光学系22によりフローセル23の中央部の図示されていない照射領域を微小スポットで照射する。フローセル23内には被検粒子である細胞が流れており、照射領域でレーザー光に照射された散乱光及び蛍光を発する。照射領域で発生した散乱光のうち、レーザー光の進行方向にほぼ一致する方向に散乱した前方散乱光は、前方散乱光集光光学系25を経て前方散乱光検出器26で検出される。このとき、直進したレーザー光はストップ24で遮光されるので、前方散乱光検出器26には到達することはない。

【0029】一方、レーザー光の方向及び細胞の流れに略平行光に変換される。この側方散乱光及び蛍光はダイクロイックミラー28、29で分光され、それぞれ側方散乱光検出器34、蛍光検出器31、37で検出される。

【0030】一般に、ダイクロイックミラーは前述のように、その分光特性に偏光特性を有する。しかしながら従来の蛍光偏光解析装置では、ダイクロイックミラーの一般的使用方法である入射角45°に拘泥していたので、正確な測定は不可能であるので、この問題点を補正するための手段を必要としている。本実施例はダイクロイックミラーへの入射角を45°よりも小さくすることにより、このような問題点を解消している。

【0031】本実施例では、ダイクロイックミラー2

8、29への入射角を予め $30^\circ$ に設定し、ダイクロイックミラー28、29の膜を入射角 $30^\circ$ 用に設計製造することで、入射角が $45^\circ$ でないにも拘らず、所期の分光特性を得られるようにしている。また、入射角を $45^\circ$ よりも小さくすることにより、偏光特性が著しく減少し、このため被検粒子である細胞が発する散乱光や蛍光の偏光特性が変化しても、この変化に影響されずにその分光特性を正確に測定することが可能となる。

【0032】つまり、分光特性を得る装置において、分光手段への入射角を $45^\circ$ よりも小さくすることにより高精度の測定を実現できる。なお、入射角が小さいほど偏光特性は減少するが、バンドパスフィルタや検出器の配列を考慮すると、入射角は $20^\circ$ から $30^\circ$ が好適である。また、ダイクロイックミラーへの入射角を小さくすることで、装置の小型化等の利点を得ることもできる。

【0033】本実施例の構成は、散乱光や蛍光の偏光解析を行う粒子測定装置にも有効である。特に、偏光手段をダイクロイックミラーよりも後方側に設ける場合は、測定値はダイクロイックミラーの偏光特性の影響を受け難いので、より正確な測定を行うことができる。例えば、通常の粒子解析装置の付加機能として、偏光解析を行えるように装置を改造する場合には、より正確で改造が小規模で済むと同時に、その他の測定光学系への影響を最小限にできるという利点がある。

【0034】図2は第2の実施例の構成図であり、図1と共通の要素及び機能の説明は省略する。図2において、前方散乱光集光光学系25と前方散乱光検出器26との間に光路を折り曲げるアルミニウム反射ミラー40が介在されている。図示しない照射領域で発生した散乱光の内、レーザー光の進行方向にほぼ一致する方向に散乱した前方散乱光は、前方散乱光集光光学系25を経てアルミニウム反射ミラー40で反射され、前方散乱光検出器26で検出される。

【0035】図2に示したように、装置の配置上、光路を折り曲げる必要がある場合には、一般にガラス基板上にアルミニウムを蒸着したアルミニウム反射ミラーが多く用いられる。ところが、このアルミニウム反射ミラーも分光反射率に偏光特性を有しており、特性改善のため蒸着したアルミニウム上に誘電体膜を何層か加えても、その偏光特性を完全に消去することは困難である。このため、前方散乱光検出器26で検出される前方散乱光強度は散乱光の偏光状態によって変化し、被検粒子である細胞の大きさを正確に測定できなくなってしまう。

【0036】ここでも第1の実施例と同様に、反射手段即ちアルミニウム反射ミラー40への入射角を小さく設定することが、分光反射率の偏光特性を減少させる上で極めて有効である。ダイクロイックミラーと同様にアルミニウム反射ミラー40も、入射角を小さくすることで分光反射率の偏光特性が著しく減少するからである。こ

の構成を被検粒子が発する散乱光や蛍光の偏光特性を測定する粒子測定装置に応用すれば、アルミニウム反射ミラー40等の反射手段を介した後に偏光手段を設けても、測定の正確性を保つことができる。また、所望の位置で光路を折り曲げられるので装置の小型化にも寄与する。

【0037】この第2の実施例では、反射手段としてアルミニウム反射ミラー40を用いたが、これは本発明の範囲を限定するものではない。反射手段がプリズム等のガラスの表面反射を利用する素子であっても、また金、銀、銅等の金属の表面反射を利用する素子であっても応用が容易である。更に、反射手段は照射光学系や側方散乱光集光光学系に設けても同様の効果が得られる。反射手段を照射光学系に入れた場合には、照射する光束の偏光方向を正確に制御できるので、被検粒子の特性を正確に測定することが可能である。

【0038】以上説明した粒子解析装置で測定する被検粒子は、細胞やラテックス粒子であったが、これも本発明の範囲を限定するものではない。被検粒子として蛋白質やペプチドや低分子のハプテンなど、分子レベルの微粒子であっても応用が容易である。

【0039】

【発明の効果】以上説明したように第1発明に係る粒子測定装置は、光路中に設けた分割手段への入射角を $45^\circ$ より小さくして分光手段の偏光特性を低減させることで、被検粒子が発する散乱光や蛍光の偏光状態に依存せずに被検粒子の特性を正確に測定することが可能である。

【0040】また、第2発明に係る粒子測定装置は、光路中に設けた反射手段への入射角を $45^\circ$ よりも小さくすることで、被検粒子が発する散乱光や蛍光の偏光状態に依存せずに、被検粒子の特性を正確に測定することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1の実施例の構成図である。

【図2】第2の実施例の構成図である。

【図3】Mie散乱の説明面である。

【図4】従来例の構成図である。

【図5】ダイクロイックミラーの偏光分光特性の入射角依存性の特性図である。

【図6】ダイクロイックミラーの偏光分光特性の入射角依存性の特性図である。

【符号の説明】

21 レーザー光源

22 照射光学系

23 フローセル

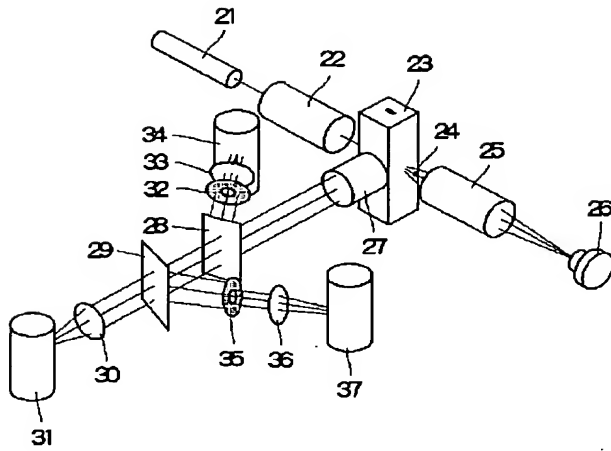
25、27 集光光学系

26、31、34、37 検出器

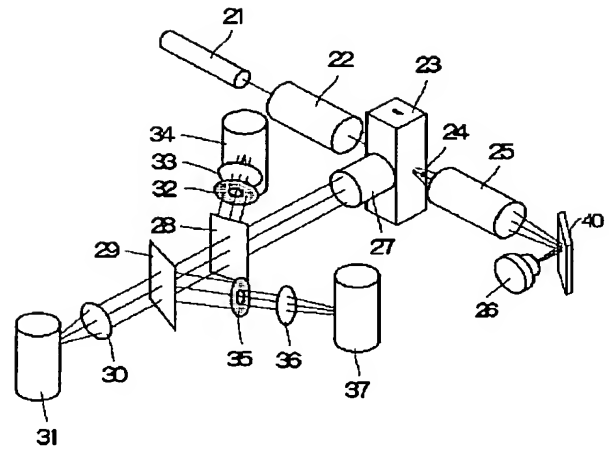
28、29 ダイクロイックミラー

40 アルミニウム反射ミラー

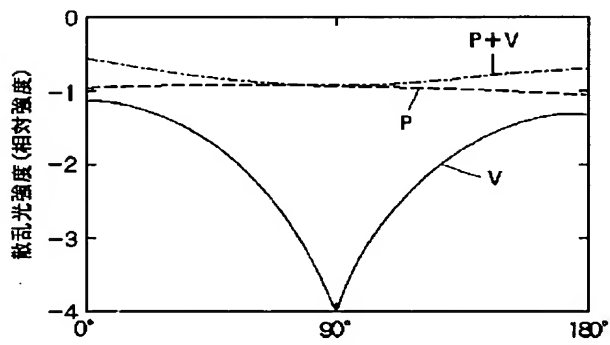
【図1】



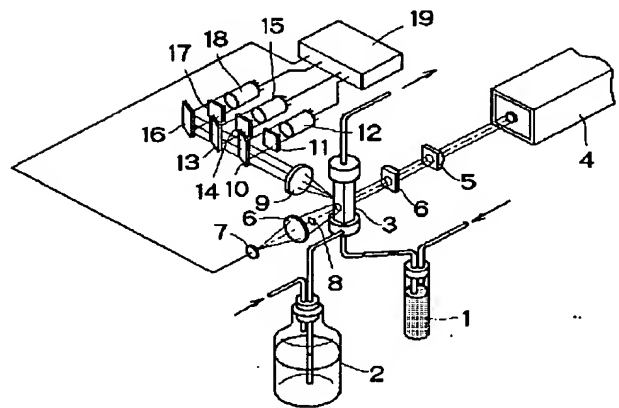
【図2】



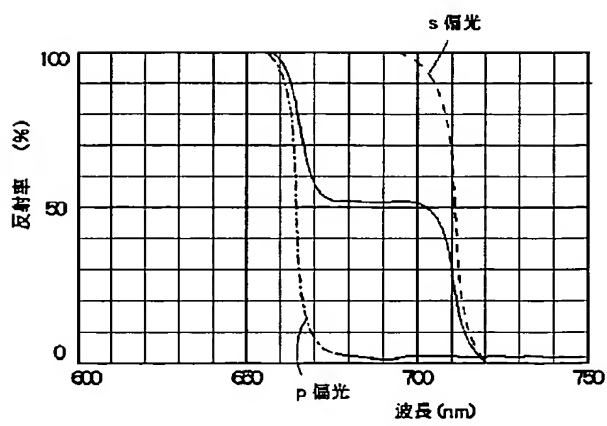
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

